

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26249021

研究課題名(和文) 電場・温度場制御による細胞・組織の接触式不可逆エレクトロポレーション

研究課題名(英文) Contact Irreversible Electroporation of Cells and Tissues under the Control of the Electric Field and Temperature

研究代表者

高松 洋 (Takamatsu, Hiroshi)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：20179550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では印加電圧を大幅に低減した表在組織治療用の接触式不可逆エレクトロポレーションの開発を行った。電気パルス印加に伴う組織の温度上昇を計測および解析する方法、さらにラマンイメージングからタンパク質熱変性を計測する方法を確立した。次に、数値計算によって寸法形状を最適化した微小表面電極を実際に製作し、生体組織を模した試料に対して施術した。その結果、パルス印加条件を変えることによって所望の深さの細胞まで壊死させられること、薬剤の併用によって印加電圧を最大30%低減できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop contact irreversible electroporation for treatment of superficial tumors by using electric pulses at extremely reduced voltages. We first developed a method to measure the temperature rise associated with considerably short electric pulses. We also showed that transient temperature rise during electroporation could be estimated by numerical analysis. Protein denaturation due to the excess electric pulses was detectable by using Raman spectroscopic measurement. We then fabricated comb-shaped miniature contact electrodes with the size and geometry optimized by numerical analysis. The electroporation with the electrode successfully necrotized the cells at the surface of a tissue phantom. Furthermore, the depth of the necrotized tissue was controllable by selecting the pulse parameters. We also confirmed that the use of adjuvants could reduce the magnitude of the electric field required for the treatment by up to 30%.

研究分野：熱工学

キーワード：不可逆エレクトロポレーション 低侵襲治療 温度計測 デバイス開発

1. 研究開始当初の背景

不可逆エレクトロポレーションは生体組織に高電圧を印加して細胞を破壊する新しいガン治療法である。細胞だけを破壊するという従来の治療方法にはない優れた特長を有するが、高電圧パルスが生体に与える影響への対策を施し、さらにジュール発熱による温度上昇を抑えて細胞外組織の熱損傷を防ぐ必要がある。

米国では動物実験を経て複数の医療機関で実際の臨床試験が行われており、現在のところ、従来の治療が適用できない症例に対する結果は良好とのことで、この方法は将来有望な治療法と期待されている。臨床試験では、穿刺電極間に 1~2 kV、パルス幅数十~数百 μs の電気パルスを心拍に同期させて数十回印加する方法が用いられている。このパルス間隔は高電圧印加による不整脈発生を防止するよう設定され、パルス幅はジュール発熱による組織の高温化がほとんど起こらないとの予測に基づいて決定されている。しかし、高電圧パルスの印加が施術中に筋収縮を招くので、筋弛緩剤を投与して全身麻酔下で行わなければならないのが現状であり、これがこの治療法の一つの欠点だと考えられる。

2. 研究の目的

前章の研究背景を踏まえて、本研究では、局所麻酔下で施術できるよう印加電圧を大幅に低減した表在組織治療用の接触式エレクトロポレーションの開発を目的とする。そのためには、①電極間距離を小さくし、②膜破壊が生じやすい長パルス電圧を印加するとともに、③パルス幅に依存して大きくなる組織の温度上昇を見積もってパルス条件を最適化することが必要である。さらに、④薬剤の投与により膜破壊電圧を低下させるドラッグアジュバントエレクトロポレーション (造語) も有効と考えられる。そこで期間内に

- (1) 組織の温度上昇とタンパク質熱変性の計測およびその予測法の確立
 - (2) 細胞破壊プロセスの観察と破壊条件の定量化および薬剤添加による電圧低減法の探索
 - (3) 低電圧印加 MEMS エレクトロポレータの開発
- を実施し、表在組織を対象としたからだにやさしい接触式エレクトロポレーションの開発を行う。

3. 研究の方法

- (1) 組織の温度上昇とタンパク質熱変性の計測

低融点アガロース溶液にアルブミンタンパク質と感温性インクを混合し、2本のステンレス鋼製電極 (直径 1 mm, 間隔 5 mm) を穿刺してゲル化させたものを試料として用いた。試料の成分比はアガロース 2 w/v%, アルブミン 5 w/v%, 感温性インク 1 v/v% である。電極間に電位差 1 kV/cm, 幅 10 μs の電気パルスを

100 ms 間隔で 75 回または 90 回与えた後、厚さ 1 mm に薄切して以降の実験に用いた。

組織の温度上昇に関しては、あらかじめ白金短細線法による試料の加熱実験の結果と数値解析とを比較することによって感温性インクの輝度値変化と温度との関係を調べた。インクの色は 53.5°C で消失し始め、57.7°C で完全に消失した。消失過程における輝度値と温度は線形の関係式で表すことができた。電気パルス印加による試料の最高温度上昇を求めるために、薄切試料を光学顕微鏡で観察して電極周囲の感温性インクの輝度値を求め、輝度値-温度関係式を用いて温度に変換した。

さらに、電気パルスを繰り返し印加したときの温度変化の履歴については、数値解析を用いて評価した。電位分布はラプラス方程式で表される。印加中の各時刻における温度分布は、電流密度と組織の導電率から計算されるジュール発熱量を発熱項に与えた非定常熱伝導方程式を解くことによって求められる。本研究では生体組織と電極の有限要素モデルを作成し、有限要素解析ソフトウェア Marc/Mentat を用いて計算した。

熱変性に関しては、電極周囲のラマンイメージング計測を行って評価した。Amide I 領域のスペクトルに注目し、アルブミンの熱変性によって生じる α -helix 構造から β -sheet 構造への変化を定量化した。

- (2) 細胞破壊プロセスの観察と破壊条件の定量化および薬剤添加による電圧低減法の探索

電気パルスを印加した後の細胞膜の穿孔状態の評価、膜電位の計測、細胞の生死判定などを等電位面に直交した面から観察できるように、マイクロギャップエレクトロポレータの設計と製作を行った。これは ITO 膜を蒸着した 2 枚のガラス基板の間に厚さ 50 μm のシリコンゴムシートを挟んだものである。この流路に膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) で染色した細胞懸濁液を滴下し、電圧印加したときの細胞膜電位の変化を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

不可逆エレクトロポレーションでは、脂質二重膜から構成される細胞膜の両面に大きな電位差を与えることによって穿孔が生じる。界面活性剤などの薬剤を添加すれば、小さな電位差でも穿孔を与えることができると思われる。そこで、細胞懸濁液に 3 種類の薬剤 (DMSO, SDS, エタノール) を添加し、平行平板電極によって電圧印加した後、細胞致死率を算出し、薬剤添加の効果を評価した。さらに、低融点アガロース溶液に線維芽細胞を懸濁し、2本のステンレス鋼製電極 (直径 1 mm, 間隔 5 mm) を穿刺してゲル化させた生体ファントム試料を用いた実験も行った。この実験では、生体ファントム試料に DMSO を 10% またはエタノールを 5% 加え、電位差 2 kV/cm, 幅 10 μs の電気パルスを 1 秒間隔で 30, 60, 90, 120, 150 回印加した。その後、

厚さ 1 mm に薄切し、生細胞をカルセイン AM で、死細胞をヨウ化プロピジウムで蛍光染色した。蛍光顕微鏡で観察して細胞の壊死面積を計算して数値解析の結果と比較することによって、細胞壊死に必要な電界強度の閾値を求めた。

(3) 低電圧印加 MEMS エレクトロポレータの開発

印加電圧を低減できる微小電極の開発のため、まず、静電場の数値シミュレーションを行い、細胞膜を破壊するために最適な電極の形状を決定した。図 1 に示すように楕円形電極を生体組織に接触させてエレクトロポレーションを行う場合に、電極幅と印加電圧を用いて無次元化したモデルにおいて数値解析を行った。この解析結果をもとに電極の幾何学形状 ($L =$ 電極間隔 l / 電極幅 w) と印加電圧が細胞壊死深さに与える影響を評価した。

数値シミュレーションによって最適な電極幅と電極間隔を決定し、実際に微小電極を作製した。第一の方法では、フォトリソグラフィ法によってガラス基板の上に白金薄膜のパターンを形成することによって作製した。第二の方法では、より厚い電極をインクジェット法によって作製した。具体的には、柔軟なポリイミドフィルム上に厚さ $2 \mu\text{m}$ の銅箔が接合された基板にレジストマーキングプリンタ (SIJ Technology 社) を用いて電極パターンのマスクを印刷した。これを化学エッチングして、マスク部分以外の銅箔を腐食除去した。さらに、スーパーファインインクジェットプリンタ (SIJ Technology) を用いて、隣接する電極の間隙に絶縁樹脂を充填した。

作製した微小楕円形電極を用いてエレクトロポレーション実験を行った。先述の線維芽細胞を懸濁した生体ファントム試料に電極を接触させ、電極間に 10, 20, 50, 100 V の電気パルス印加した。パルス幅は $10 \mu\text{s}$ または $100 \mu\text{s}$ の 2 通りとし、1 秒間隔で 90 回印加した。その後、試料を深さ方向にスライスし、生細胞をカルセイン AM で、死細胞をヨウ化プロピジウムで蛍光染色して細胞壊死深さを計測した。

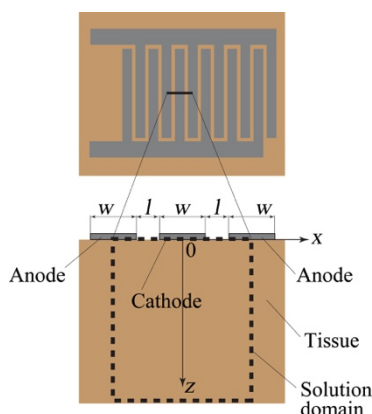


図 1 接触式エレクトロポレーションの解析モデル。

4. 研究成果

(1) 電気パルス印加による温度上昇の計測

感温性インクを混ぜたアガロースゲルに穿刺電極によって電気パルスを印加した後、薄切して観察した電極近傍の顕微鏡像を図 2 に示す。過去の研究によって高い温度上昇を生じることが予想されていた電極根元を通る断面を観察領域とした。電極周囲の感温性インクの色は電気パルスを 75 回印加しても変化しなかったが、90 回印加すると薄くなっていた。陰極と陽極を結ぶ直線上において計測した輝度値を輝度値-温度関係式を用いて温度に換算した結果を図 3 に示す。電気パルスを 75 回印加しても、温度上昇はすべての領域で感温性インクの検出限界温度 53.5°C 以下であった。一方、90 回印加すると陰極から 0.6 mm 以内の領域で 53.5°C を超える温度上昇が認められた。また、陰極から 0.2 mm 以内では 55.3°C を超える温度になっていたことが明らかになった。

次に、有限要素解析によって計算した電気パルス印加中の温度変化を図 4 に示す。パルス印加によって瞬間的に約 9 K の温度上昇を生じるが、次のパルスを印加するまでのインターバル 100 ms の間に熱が消散することが示された。しかし、電気パルスの印加を繰り返すと徐々に最高温度と最低温度が上昇していき、90 回の印加時には最高温度が 59°C に達した。これは感温性インクを用いた実験より得られた最高温度の値とほぼ一致した。

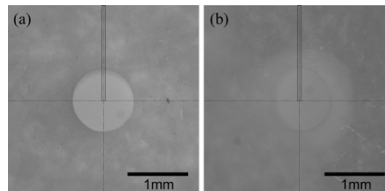


図 2 試料断面の顕微鏡像の例。(a)75 回, (b)90 回印加。

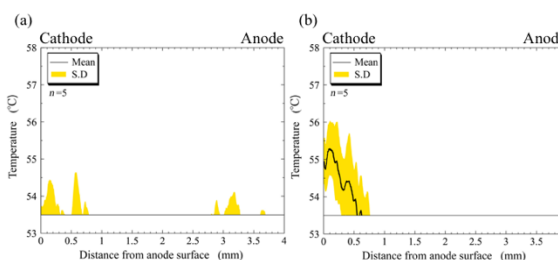


図 3 感温性インクの輝度値より求めた温度分布。(a)75 回, (b)90 回印加。

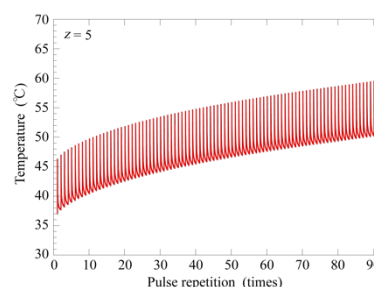


図 4 有限要素解析より得られた電極根元部分の温度履歴。

(2) 電気パルス印加によるタンパク質熱変性の計測

アルブミンタンパク質のラマンスペクトル、特に Amide I 領域のスペクトルを熱変性前後で比較すると、熱変性前に認められる 1660 cm^{-1} 近傍のピークが、熱変性後には 1670 cm^{-1} にシフトしていた。これは、タンパク質の α -helix 構造が熱変性によって β -sheet 構造へ変化したことを示している。そこで実験で得られたスペクトルに対して 1660 cm^{-1} と 1670 cm^{-1} にピークを持つ 2 つの参照スペクトルをフィッティングさせることによって Amide I 領域のスペクトルを分離し、それぞれの寄与率から α -helix 構造と β -sheet 構造の含有率に相当する値を算出した。そして全体に占める β -sheet 構造の割合を変性指標として定義した。あらかじめ完全に熱変性させたアルブミン試料のラマンスペクトル計測を行い、熱変性を示す閾値を決定した。図 5 は(1)で述べたのと同じ実験試料に対して計測された変性指標の分布である。電気パルスを 75 回印加しても変性指標は閾値 0.277 を超えなかったが、90 回印加すると陰極より 0.3 mm 以内の領域で閾値を超え、熱変性の発生が示唆された。この領域は、(1)の温度上昇の計測において 54.4°C 以上の温度を示した領域に相当している。これらの結果は、一般的に考えられているタンパク質の変性温度と一致している。

以上の研究により、生体試料にエレクトロポレーションを行った際の温度分布の解析方法、最高温度上昇の計測方法、さらにその最高温度上昇量がタンパク質の変性危険温度に達しているかどうかを計測する方法を確立した。特に厳しいパルス印加条件では、電気パルスの印加に伴って陰極近傍組織の温度上昇と変性が顕著に生じることを初めて明らかにした。これは陽極と陰極の電極界面で生じる化学反応の違いに起因するものと推察される。

(3) 細胞破壊プロセスの観察と破壊条件の定量化

ITO 膜を蒸着したガラス製透明電極 2 枚でシリコンラバー製流路を挟んだ構造のマイクロギャップエレクトロポレータを試作し、流路内の細胞に電気パルスを与えながら共焦点レーザー顕微鏡で観察できるシステムを構築した。まず、CC2-DMPE と DiSBAC₂(3) によってあらかじめ細胞を染色し、FRET 現象を用いて膜電位の計測を試みた。陽極側の細胞膜が破壊し、細胞質が外部へ流出する様子を観察

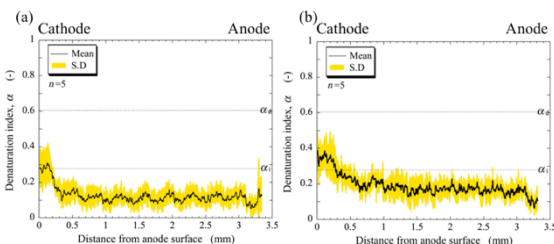


図 5 ラマンスペクトルから求めた変性指標の分布。(a)75 回、(b)90 回印加。

することはできたが、膜破壊直前に生じるはずの膜電位の変化を計測するには時間分解能が不十分であった。次に、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)を用いた実験では、電気パルス印加後に細胞内の蛍光強度が上昇する過程を計測できた。この上昇には膜電位の変化だけでなく、膜穿孔による蛍光色素の細胞内拡散が関与していると思われた。

細胞膜破壊の閾値については、平行平板電極を有するキューベットに細胞懸濁液を入れ、これに種々の条件の電気パルスを与える実験を行って調査した。その結果、印加回数を変数として細胞致死率の増加をフェルミ分布関数で表せることを示した。また、パルス幅やパルス間隔がフェルミ分布関数における傾きと 50%致死率を与えるパラメータに与える影響を明らかにした。印加電圧、印加回数、パルス幅が増すほど細胞膜破壊が得られやすいことはあらかじめ予想できることであったが、本研究ではパルス間隔が長いほど、つまり膜修復に費やせるパルス間の待ち時間が長いほど細胞致死率の増加が著しくなるという新しい知見を得た。これはこれまでの予想に反する結果であった。細胞膜穿孔による試料の電気的特性の変化や電極分極による実印加電圧の低下などが原因ではないかと調査したが、これらの仮説は否定され、原因究明には至っていない。

(4) 低電圧印加 MEMS 電極の開発のための数値シミュレーション

図 6 に電極間隙を電極幅で無次元化した値 L が 0.25, 0.5, 1, 1.5 のときの電界分布を示す。電界は電極のエッジ部分で大きく、深さが増すと急激に小さくなった。図中の破線は、細胞膜が膜電位 1 V で破壊されると仮定し、直径 $16\text{ }\mu\text{m}$ の細胞に対して幅 $100\text{ }\mu\text{m}$ の電極を用いて 20 V の電圧を印加したとき、得られる細胞壊死領域である。このような解析を 4 通りの L と種々の電極幅に対して行い、印加電圧と最大壊死深さの関係を得た。この結果から電極幅 $200\text{ }\mu\text{m}$ 、電極間隙 $50\text{ }\mu\text{m}$ が最適な

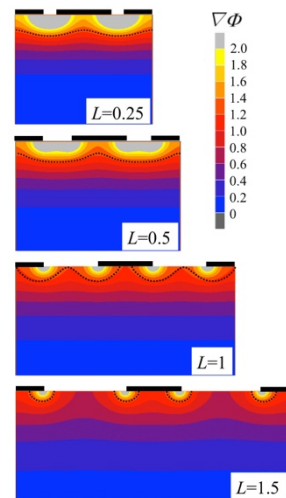


図 6 電極間隙/電極幅が 0.25, 0.5, 1, 1.5 のときの電界分布。

形状であると決定した。

(5) 低電圧印加 MEMS 電極によるエレクトロポレーション実験

(4)の電場解析の結果をもとに、実際にフォトリソグラフィ法を用いて微小表面エレクトロポレータを作製した。線維芽細胞を分散させた生体ファントム試料に対して電気パルス印加し、表層の細胞が壊死することを蛍光染色によって確認した。しかし、共焦点レーザー顕微鏡によって観察された細胞壊死深さは電界分布の数値解析から予想される深さの約半分であった。電圧を 100 V、パルス長さを 100 μs まで大きくしても表層より 100 μm 程度の細胞しか壊死させることはできなかった。これは、電極が非常に薄く(厚さ約 50 nm)、電圧印加によって電極の溶断や剥離を生じることが原因と考えられた。

そこで、柔軟なポリイミドフィルム上に厚さ 2 μm の銅箔が接合された基板にインクジェット印刷技術を用いてマスクを印刷し、エッチングして図 7 のような新たな微小電極を作製した。生体ファントム試料を対象に電気パルスの印加を行い、蛍光染色を施して生死細胞を観察した結果を図 8 に示す。赤色蛍光

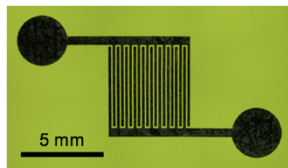


図 7 インクジェット印刷技術を利用して作製した微小表面エレクトロポレータ。

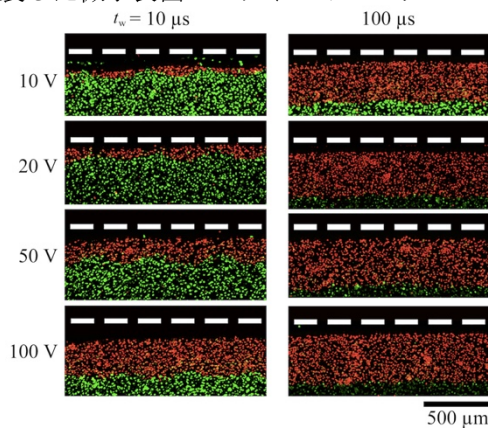


図 8 電気パルス(パルス間隔 1 s, 90 回)印加後の死細胞(赤)と生細胞(緑)の分布。

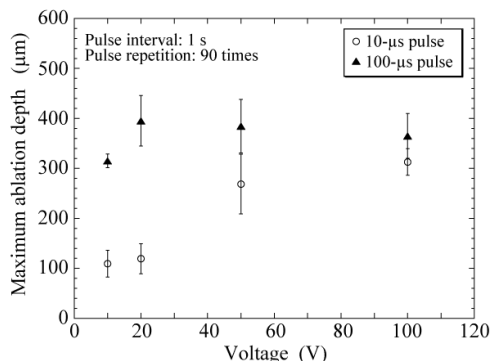


図 9 最大壊死深さと印加電圧の関係。

を発生する壊死細胞の層は印加電圧が増すほど、またパルス幅が大きいほど厚くなった。顕微鏡画像から最大壊死深さを計測した結果を図 9 に示す。最大壊死深さは電圧依存的に増したが、パルス幅 100 μs の条件では電圧 20 V でプラトーに達し、約 400 μm であった。

(6) 薬剤添加による電圧低減

細胞懸濁液に 3 種類の薬剤(DMSO, SDS, エタノール)を添加し、平行平板電極によって電気パルスを印加した後、細胞致死率を算出した結果を図 10 に示す。SDS については電気パルスを印加しなくても細胞の致死率が高く、無視できないほどの毒性の高さが明らかになった。細胞毒性が小さい濃度範囲で考えると、濃度 10%の DMSO または濃度 5%のエタノールの添加によってそれぞれの細胞致死率を 25%, 30%増加させられた。

また、生体ファントム試料を用いた実験において、電気パルス印加後に試料を電極中央断面でスライスし、蛍光染色によって生死細胞の分布を観察した結果を図 11 に示す。壊死領域は印加パルス数とともに増すが、エタノール 5%を添加した実験群で最も大きな壊死面積が得られた。壊死面積を計測して比較した結果を図 12 に示す。この壊死面積を数値解析によって得られる電界分布と比較することによって細胞壊死に必要な電界強度の閾値(臨界電界強度)を求めた。図 13 に示すように、印加回数が 90 回を上回ると臨界電界強度はほぼ一定値となった。その値を比較すると、DMSO を 10%またはエタノールを 5%添加す

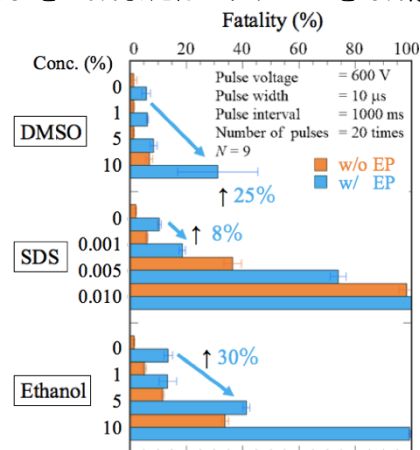


図 10 薬剤添加が不可逆エレクトロポレーションによる細胞致死率に与える影響。

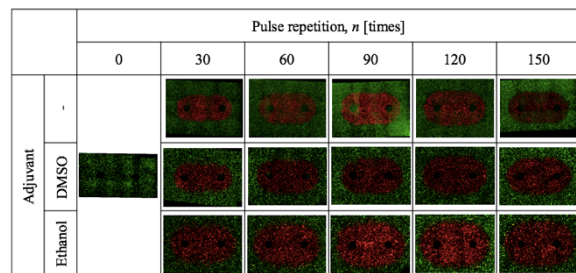


図 11 薬剤添加した生体ファントム試料における電気パルス印加後の死細胞(赤)と生細胞(緑)の分布。

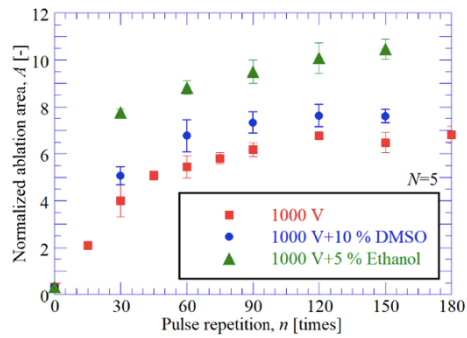


図12 薬剤添加が細胞壊死面積に与える影響.

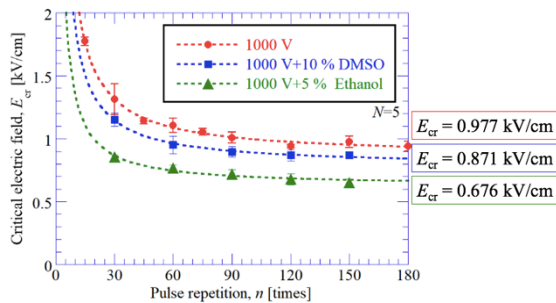


図13 薬剤添加が臨界電界強度に与える影響.

ることによって臨界電界強度をそれぞれ 11%, 31%減少させられることが明らかとなり, 薬剤添加による低電圧化の効果を示すことができた.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① S. Yoshimatsu, M. Yoshida, K. Kurata, H. Takamatsu, Development of contact irreversible electroporation using a comb-shaped miniature electrode, *Journal of Thermal Science and Technology*, 査読有, Vol. 12, No. 2, Paper No.16-00690 (10 pages), 2017.
- ② K. Kurata, T. Yoshii, Y. Deguchi, H. Takamatsu, Raman microspectroscopic detection of thermal denaturation associated with irreversible electroporation, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 査読有, Vol. 111, pp. 163-170, 2017.
- ③ 藏田, 高松, 電場・温度場制御による細胞・組織の不可逆エレクトロポレーション, 伝熱, 査読無, Vol. 56, No. 234, pp. 7-16, 2017.
- ④ K. Kurata, H. Takamatsu, Irreversible electroporation: Medical application of intense electric pulses for sustainable health, *AIP Conference Proceedings* 1717, 査読無, 020002 (7 pages), 2016.
- ⑤ H. Takamatsu, K. Kurata, Engineering approach to irreversible electroporation, *Proceedings of the 15th International Heat Transfer Conference*, 査読有, IHTC15-KN05 (18 pages), 2014.
- ⑥ K. Kurata, S. Nomura, H. Takamatsu, Three-dimensional analysis of irreversible

electroporation: Estimation of thermal and non-thermal damage, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 査読有, Vol. 72, pp. 66-74, 2014.

[学会発表] (計 24 件)

- ① K. Fukunaga, et al., Effect of surfactant addition on the threshold of irreversible electroporation, *Ninth Asian Pacific Conference on Biomechanics*, Brisbane, 2017.
- ② 吉松・他 2 名, 接触式楕円電極を用いた生体模擬組織の低電圧不可逆エレクトロポレーション, 第 54 回日本伝熱シンポジウム, 2017.
- ③ S. Yoshimatsu, et al., Development of comb-shaped miniature electrode for contact irreversible electroporation, *The 27th International Symposium on Transport Phenomena (ISTP27)*, 2016.
- ④ K. Kurata, et al., Contact Irreversible Electroporation for a Less-Invasive Tissue Ablation, *Twelfth International Conference on Flow Dynamics*, 2015.
- ⑤ K. Kurata, et al., Feasibility Study on Contact Irreversible Electroporation for Superficial Tumor Treatment by Using Miniature Electrodes, *Eighth Asian Pacific Conference on Biomechanics*, 2015.

他 19 件

[その他]

ホームページ等 http://www.mech.kyushu-u.ac.jp/~hmt/HMT_lb.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

高松 洋 (TAKAMATSU, Hiroshi)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 20179550

(2)研究分担者

藏田 耕作 (KURATA, Kosaku)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 0036887

福永 鷹信 (FUKUNAGA, Takanobu)
九州大学・大学院工学府・技術職員
研究者番号: 60591196

(3)連携研究者

住本 英樹 (SUMIMOTO, Hideki)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 30179303

大屋 祐輔 (OYA, Yusuke)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30240964